

Die Abhängigkeit
der Fettsäuresynthese von einem
Faktor der Leber

von

PETER SCHREIER

München 1960

Aus der
Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Seitz

D I E A B H Ä N G I G K E I T D E R
F E T T S Ä U R E S Y N T H E S E
V O N E I N E M F A K T O R D E R L E B E R

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
P e t e r S c h r e i e r
aus Regensburg

München
1960

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Seitz

Dekan: Prof. Dr. H. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung: 14.6.1960

Inhaltsverzeichnis

- 1) Einleitung
 - a) Der Fettabbau
 - b) Der Fettaufbau
 - c) Zum Thema
- 2) Methodik
 - a) Zubereitung der Enzymlösung
 - b) Der Versuchsansatz
 - c) Verseifung und Lösung der Fettsäuren
 - d) Messung der Ergebnisse
 - e) Faktorzubereitung
 - f) ATP-Test
- 3) Ergebnisse
- 4) Diskussion
- 5) Zusammenfassung
- 6) Literatur

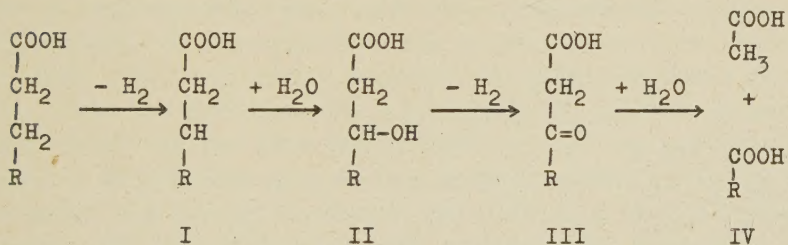


1. Einleitung

a) Der Fettabbau

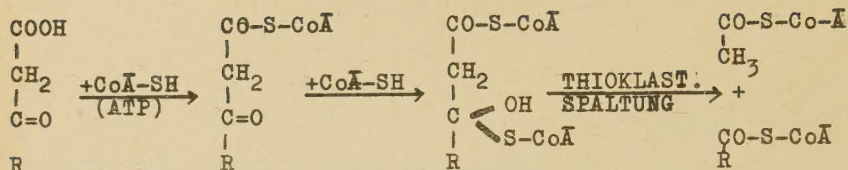
Die Endprodukte des normalen Fettsäureabbaues sind Kohlensäure und Wasser. Das bedeutet, daß die mehr oder weniger langen Kohlenstoffketten der Fettsäuren vollständig zerlegt werden müssen, ohne daß sich dabei irgendwelche Zwischenprodukte anhäufen. Dies geschieht auf einem Weg, der durch F. Knoop (1) aufgeklärt wurde. Er verfütterte phenylsubstituierte Carbonsäuren und fand deren Spaltprodukte, die alle den unverdaulichen Benzolring enthielten, im Harn seiner Versuchstiere wieder.

Knoop stellte fest, daß die Fettsäuremoleküle fortlaufend um zwei Kohlenstoffatome verkürzt werden. Da nach seinen Beobachtungen die Spaltung stets am β -ständigen C-Atom erfolgte, prägte er den Begriff der " β -Oxydation". Die Abtrennung von je zwei Kohlenstoffatomen geschieht durch zweimalige Dehydrierung und jeweils anschließende Hydrolyse:



Durch Wiederholung dieser Reaktionsfolge werden die Fettsäuren schrittweise abgebaut.

Die Bildung der Zwischenprodukte I, II und III entspricht ganz der Reaktionsfolge im Zitronensäurezyklus. Zur Spaltung der β -Ketocarbonsäuren (III) ist Coenzym A nötig. Die Zerlegung der energiereichen CoA-Derivate der Ketocarbonsäuren ist nur auf dem Weg der "Thioklastischen Spaltung" möglich:



Demnach entstehen beide Carbonsäuren in Form ihrer Coenzym- $\bar{A}$ -Derivate. Alle anfallenden, durch Coenzym- $\bar{A}$ aktivierten Essigsäuremoleküle gehen ohne weitere Zwischenreaktionen sofort in den Zitronensäurezyklus ein und finden so Anschluß an den Kohlenhydratstoffwechsel.

b) Der Fettaufbau

Grundsätzlich verläuft die Synthese der Fette auf dem selben Wege wie der Abbau, d.h. die zur Synthese verfügbaren C_2 -Fragmente werden schrittweise zu höheren Fettsäuren zusammengeschlossen. Die einzelnen Reaktionsstufen sind in der sog. "Fettsäurespirale" von F. Lynen formuliert (2, 3, 4).

Der an zwei Stellen der Spirale zur Hydrierung benötigte Wasserstoff wird jeweils durch die Warburg'schen Codehydrasen I und II (DPNH und TPNH) zur Verfügung gestellt. Diese entstehen im Verlauf der Glykolyse, und zwar DPNH bei der Dehydrierung der Triosephosphats und TPNH bei der Dehydrierung der phosphorylierten Glukose zu 6-Phosphoglukonsäure (=Hexokinaserreaktion). Die Höhe der Fettsäuresynthese ist demnach u.a. von einem ausreichenden Angebot an DPNH und TPNH abhängig.

In einer früheren Arbeit konnten V. v. Brand und E. Helmreich (5) in Übereinstimmung mit anderen Autoren eine gewisse Parallelität zwischen Glykolyse und Fettsäuresynthese experimentell belegen.

c) Zum Thema

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Fragen der Fettsäuresynthese. Die hierzu nötigen Experimente wurden mit einem nach Angaben von Brady und Gurin (6) hergestellten löslichen Fermentsystem durchgeführt. Mit Hilfe der darin enthaltenen Enzyme gelang es, aus C^{14} -markiertem Natriumazetat als Ausgangssubstrat höhere Fettsäuren zu synthetisieren. Allerdings waren dem Fermentsystem gleichzeitig verschiedene Cofaktoren wie Magnesiumchlorid, Na-zitrat und Manganchlorid (7, 8) zuzusetzen.

Bei der Zubereitung des Fermentsystems fanden V. v. Brand und W. Seitz (9, 10) in einem bei früheren Versuchen verworfenen Rückstand einen "Faktor", der die Fettsäuresynthese stark zu fördern vermochte. Dieser "Faktor" war nur aus den Lebern normal ernährter Tauben zu gewinnen. Ließ man dagegen die Tiere 72 Stunden fasten, so enthielten ihre Lebern keinen "Faktor" mehr.

Im Folgenden wird über experimentell gefundene Eigenschaften dieses "Faktors" berichtet.

2. Methodik

a) Zubereitung der Enzymlösung

Zur Darstellung des Fermentsystems wurden die Lebern junger Tauben verwendet. Die Tiere wurden nach ausgiebiger Fütterung mit Weizenkörnern durch Decapitation getötet, die Lebern freipräpariert, exstirpiert und sofort in Eiswasser auf 0° Celsius abgekühlt, damit möglichst alle fermentativen Abbauvorgänge unterbunden wurden. Nach gründlicher Reinigung von Blutgerinnseln und oberflächlichem Bindegewebe wurden die Lebern mit Filterpapier getrocknet, gewogen und unter Zusatz von Puffer nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Auf 1 g Leber kamen dabei 1,2 ml Pufferlösung, welche sich wie folgt zusammensetzte:

1) m/15 KH_2PO_4 und zwar 9,078 g auf 1000 ml H_2O

2) m/15 Na_2HPO_4 und zwar 11,876 g auf 1000 ml H_2O

Davon wurde eine Mischung mit folgendem Mengenverhältnis hergestellt und verwendet:

81,8 ml Na_2HPO_4 + 18,2 ml KH_2PO_4 + 0,7 g KHCO_3

Das fertige Homogenat wurde nun in drei Stufen zentrifugiert:

- 1) 45 Min. niedertourig bei 2000 Umdr. Der Überstand wurde sorgfältig abgegossen und
- 2) 10 Min. hochtourig bei 25000 Umdr. abgeschleudert. Das nunmehr Überstehende verdünnte man mit Puffer soweit, daß man pro g Ausgangsgewicht an Lebersubstanz jetzt 1,33 ml Homogenat erhielt. Dieses wurde anschließend
- 3) 60 Min. lang nochmals hochtourig zentrifugiert.

Die aus diesem Arbeitsgang resultierende überstehende, lösliche Phase, eine klare, rotbraune Flüssigkeit, enthielt die zum Experimentieren benötigten Fermente in Puffer gelöst (pH 7,0 - 7,3).

Brady und Gurin beschreiben noch eine weitere Reinigung der Fermentlösung mittels einer präparativen Ultrazentrifuge (100000 Umdr.), doch mußte dies in Ermangelung der dazu nö-

tigen Apparatur unterbleiben.

Von besonderer Bedeutung für die Qualität der Enzymlösung war neben dem Ernährungszustand der Tiere die rasche Abkühlung der exstirpierten Organe und die sorgsame Beibehaltung der niederen Temperaturen bei möglichst hohem Arbeitstempo. Entscheidend war fernerhin, vor allem für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, eine gewisse Übung beim Homogenisieren.

b) Der Versuchsansatz

In geeichte Warburg-Kölbchen von 20 ml Fassungsvermögen wurden bestimmte Mengen der Enzymlösung einpipettiert. Dazu kamen als Cofaktoren Na-zitrat und Mn-chlorid, sowie radioaktiv markiertes Na-1 - C^{14} - Azetat. Zu diesem Gemisch wurden grundsätzlich die auf ihre Wirksamkeit zu testenden Substanzen gegeben. Jedes Kölbchen enthielt letztlich:

2,4 ml Überstand

0,1 ml Na - Citrat (Lösung: 3,22 g a.50 ml Aqua bidest.)
= 0,01 m

0,1 ml Mg - Chlorid (" 856 mg a.50 ml Aqua bidest.)
= 0,006 m

0,4 ml Na - Azetat (2mg wasserfr. Na-Azetat a.0,4 ml
Aqua bid. = 110 000 Impulse pro Min.)
= 0,008 m

Die Menge an Enzymlösung wurde variiert, je nach der Menge der zu prüfenden Substanz. Ein vermehrter Zusatz von Testsubstanz wurde durch eine Verminderung der Enzymmenge ausgeglichen, doch blieb letztere innerhalb einer Versuchsreihe stets konstant. Der Kölbcheninhalt wurde dann mit Puffer bzw. Aqua bidest. soweit aufgefüllt, daß jedes Gefäß zur Inkubation 3 ml Substanz enthielt.

Jeder Ansatz mußte drei Stunden lang im Warburg-Apparat bei 38° Celsius inkubiert werden. Spezielle versuche zeigten, daß nach dieser zeit das Maximum der Fettsäuresynthese erreicht ist. Die Inkubation erfolgte je nach Versuchsansatz unter aeroben (Luft) oder anaeroben (Argon) Bedingungen. Die Begasung dauerte 10 Minuten. In besonderen Versuchsreihen wurde auch CO₂ verwendet.

c) Verseifung und Lösung der Fettsäuren

Der Inhalt der Kölbchen wurde mit je 7 ml Aqua bidest. in birnenförmige Verseifungskölbchen überspült. Dazu kamen 5 ccm alkoholische Kalilauge und 25 mg Palmitinsäure als Trägersubstanz. Das Ganze wurde 4 Stunden am Rückflußkühler verseift. Dann spülte man den gesamten Kölbcheninhalt mit Petroläther in Schütteltrichter, setzte jedem Versuch 6 Tropfen Indikator (Bromkresylgrün - Methylorange) zu und säuerte mit 12%-iger Salzsäure bis zum Farbumschlag an. Die freigesetzten Fettsäuren wurden durch viermaliges Ausschütteln mit Petroläther und Verdampfen des letzteren aus dem Gemisch extrahiert und schließlich wiederum in Petroläther gelöst und in Meßkölbchen auf 10 ml aufgefüllt.

d) Messung der Ergebnisse

Die Aktivität der einzelnen Versuche wurde nach der direkten Methode von Entenman und Dauban bestimmt. Man tropfte je 1 ml der Petrolätherauszüge auf Aluminiumplättchen mit Rand (2,5 cm Durchmesser), welche mit sog. "Lenspaper" (Firma Rodenstock) belegt waren. In einem Geigerzählgerät (FH 49) der Firma Friesecke und Hoepfner (Erlangen-Bruck) wurde die Radioaktivität der Plättchen gemessen und zwar bei konstanter Arbeitsspannung (1,4 kv) und konstantem Abstand der Plättchen vom Zählrohr. Die Ergebnisse wurden auf einen Standardfolienwert umgerechnet. Der Nullwert wurde jeweils gemessen und abgezogen. Für jeden Versuch wurden 4 Plättchen gegossen, gemessen und der Mittelwert errechnet. Die durchschnittliche Impulszahl/Min. multiplizierte man mit der Zahl 10 und erhielt so die Aktivität der gesamten in einem Auszug enthaltenen markierten Fettsäuren. Die Aktivität wird demnach angegeben in Impulsen mal 10^4 pro Min. und pro Versuchsansatz.

e) Faktorzubereitung

Beim letzten hochtourigen Zentrifugieren fand sich normalerweise ein hellklarer, gallartiger Rückstand. Dieser enthielt unter anderem den wirksamen Faktor. Zur Präparation desselben mußte der Rückstand solange im kochenden Wasserbad erhitzt werden, bis eine zähe dunkelbraune Masse übrigblieb. Mit 1 - 2 ml Puffer aufgenommen und homogenisiert erwies sie sich in dieser Form als wirksam.

Die zugegebene Puffermenge wurde geringfügig variiert. Es ließ sich kein absolutes Mengenverhältnis festlegen. Erfahrungsgemäß ging beim zweiten Zentrifugieren (10 Min. hocht.) bereits ein Großteil der Faktorsubstanz mit dem Rückstand verloren. Deshalb wurde in allen Fällen, in denen es auf die Gewinnung möglichst großer Mengen Faktor ankam, dieser Arbeitsgang unterlassen. Das Homogenat wurde vielmehr sofort nach dem niedertourigen Abschleudern in der beschriebenen Weise mit Puffer verdünnt und 75 Min. lang hochtourig zentrifugiert. Die Qualität der Enzymlösung änderte sich dadurch nicht nachweislich.

f) ATP-Test

Um einen Einblick in den Verlauf der Fettsynthese zu erhalten und möglicherweise eine Aussage über die Energieverhältnisse machen zu können, wurden einige Versuche zu verschiedenen Zeiten während der Inkubation unterbrochen und neben der Höhe der Fettsäuresynthese auch der ATP-Gehalt bestimmt.

Der angewendete ATP-Test ist ein sog. gekoppelter enzymatischer Test (Warburg). Er beruht im Prinzip auf der quantitativen Bestimmung der TPNH, welches bei der Dehydrierung der phosphorylierten Glukose zu 6-Phosphoglukonsäure unter Mitwirkung des Warburg'schen Zwischenferments entsteht:

- 1) ATP + Glukose $\xrightarrow{\text{Hexokinase}}$ Glukose-6-Phosphat + ADP
 2) Glukose-6-Phosphat + TPN $\xrightarrow{\text{Z.F.}}$ 6-Phosphoglukons. + TPNH+H⁺

Zur Phosphorylierung der Glukose wird ATP benötigt. Solange ATP verbraucht wird (1), kann TPNH gebildet werden (2). Mit dem völligen Abbau des vorhandenen ATP endet demnach auch die TPNH-Bildung. Gemessen wird im Photometer Eppendorf die Extinktionszunahme des gebildeten TPNH.

Zur Durchführung des Tests werden nach erfolgter Inkubation je 1 ml Überstand mit 1 ml kalter 0,6 n Perchlorsäure enteiweißt und 10 Min. bei 0° Celsius und 25 000 Umdr./Min. zentrifugiert. Anschließend stellt man den klaren Überstand mit 0,5 n KOH auf einen pH-Wert von 7,4 ein und läßt ihn etwa 15 Minuten im Eis stehen, damit sich die ausfallende KCL O₄ absetzen kann.

Zur photometrischen Bestimmung des ATP-Gehalts werden

- 4,00 ml Triäthanolamin-Puffer (pH = 7,4)
- 0,20 ml einer 0,1 mol. Magnesiumchloridlösung
- 0,45 ml einer 0,5 mol Glukoselösung
- 0,20 ml der vorsichtig dekantierten Testlösung und
- 0,05 ml einer TPN-Lösung (2 mg TPN/1 ml Aqua bidest.)

in eine Meßküvette einpipettiert und gut vermischt. Die Extinktion dieser Lösung wird als Ausgangswert notiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml einer Hexokinase-Zwischenfermentlösung (15 mg Hexokinase + 2 mg Z. F. pro ml Aqua bidest.) gestartet.

Sobald alles ATP aufgebraucht ist, sistiert auch die TPNH-Bildung. Durch den sog. Nachstart wird die Eigenextinktion der Hexokinase-zwischenfermentlösung bestimmt. Diese zieht man von der Differenz zwischen Ausgangswert und Endwert ab und erhält so die Extinktionsdifferenz.

Von der Extinktionsdifferenz ausgehend erfolgt die Berechnung des ATP-Gehalts nach der Formel:

$$\frac{E \times 507 \times 4,95 \times \text{Vol.}}{6,22 \times 2 \times 0,2 \times 1000} = \mu\text{ ATP/ml Testlösung}$$

- E = Extinktionsdifferenz
507 = Molekulargewicht von ATP
4,95 = Gesamtinhalt der Küvette in ml
Vol. = Volumen der enteiweißten und neutralisierten
Reaktionslösung (1 ml Lösung + 1 ml Perchlorsäure + 1 ml KOH)
6,22 = molare Extinktion von ATP
2 = Schichtdicke (cm) der Testlösung im Strahlengang
0,2 = pro Küvette eingesetzte ATP-haltige Lösung
1000 = Multiplikator der Skalenwerte

Außer E und Vol. sind sämtliche Werte konstant. Obige Formel ist demnach wie folgt zu vereinfachen:

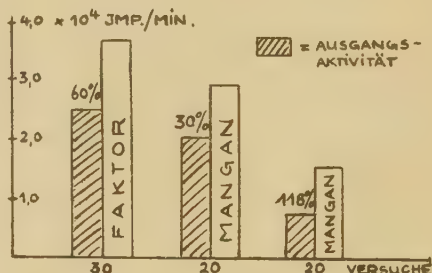
$$E \times \text{Vol.} \times 1,0087 = \mu \text{ ATP/ml Testlösung}$$

3. Ergebnisse

Ein Bild vom Ausmaß der Faktorwirksamkeit geben 30 ausgewählte Versuche, bei denen die Ausgangsaktivität (= Aktivität eines Versuchsansatzes ohne Zugabe von Faktor oder einer anderen Substanz) bereits über $1,0 \times 10^4$ Impulsen pro Minute und pro Versuchsansatz lag. Dabei ergab sich für die Versuche ohne Faktorzusatz ein Durchschnittswert von $2,3 \times 10^4$ Impulsen pro Minute und pro Versuch. Demgegenüber steht eine Erhöhung der Fettsäuresynthese nach Faktorzusatz in parallellaufenden Ansätzen auf durchschnittlich $3,4 \times 10^4$ Impulse. Das entspricht einer Förderung von knapp 60 %.

Abb. 1:

Prozentuale Steigerung der Fettsäuresynthese nach Zusatz von Mangan bzw. Faktor



Zum Vergleich sei eine Gegenüberstellung von 20 Versuchen mit und ohne Manganionen angeführt, bei Ausgangswerten von gleichfalls mindesten $1,0 \times 10^4$ Imp./Min. Durch Mangan⁺⁺ erhöhte sich die Fettsäuresynthese nur um etwa 30 %. Bemerkenswert ist, daß für die Wirksamkeit von Manganionen die Höhe der Ausgangsaktivität von Bedeutung war. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, zeigten Manganionen bei Ausgangswerten unter $1,0 \times 10^4$ Imp./Minute weit größere Wirkung als bei entsprechend höhergelegener Ausgangsaktivität.

Für den Faktor war eine ähnliche Beziehung nicht festzustellen. Hier war die prozentuale Steigerung der Fettsynthese praktisch unabhängig von der Ausgangsaktivität des Versuchsansatzes.

Nicht in allen Fällen konnte man den Einbau markierten

Natriumazetats in höhere Fettsäuren durch Faktorzusatz erhöhen. Zeitweilig trat sogar eine mehr oder minder starke Hemmung ein. Gab man jedoch solchen hemmenden Faktor einem anderen Versuchsansatz bei, so vermochte er unter bestimmten Voraussetzungen (siehe Tab. 1) in diesem Ansatz die Fettsäuresynthese ohne weiteres zu steigern.

Tabelle 1:

Die Abhängigkeit der Faktorwirkung von der Qualität der Enzymlösung

FAKTOR I IM EIGENEN FERMENT- SYSTEM	FAKTOR I IM FREIEM FERMENT- SYSTEM	FAKTOR II IM EIGENEN FERMENT- SYSTEM	VERSUCHE
HE	FÖ	FÖ	4
FÖ	HE	HE	4
HE	HE	HE	1
FÖ	FÖ	FÖ	1

Ein Faktorpräparat, das in dem einen Fermentsystem unwirksam war, konnte also jederzeit in einem anderen System voll wirksam sein, wenn der bei der Herstellung dieses anderen Fermentsystems aus dem Zentrifugenrückstand gewonnene Faktor gleichfalls die Fettsynthese steigerte. Es hing also unter anderem von der Qualität der Enzymlösung ab, ob der Faktor seine Eigenschaften in der erwarteten Richtung entfalten konnte oder nicht. Damit war es möglich, den bei mehreren Enzympräparationen gewonnenen Faktor zu sammeln. Auf diese Weise erhielt man genügend gleichartiges Material für umfassendere Versuche.

In den meisten Fällen erhielt man bei Zugabe von 0,1 ml eines Faktorpräparats die optimale Menge an synthetisierten markierten Fettsäuren. Mit steigender Konzentration trat eine deutliche Abnahme der Fettsäuresynthese ein (Abb. 2).

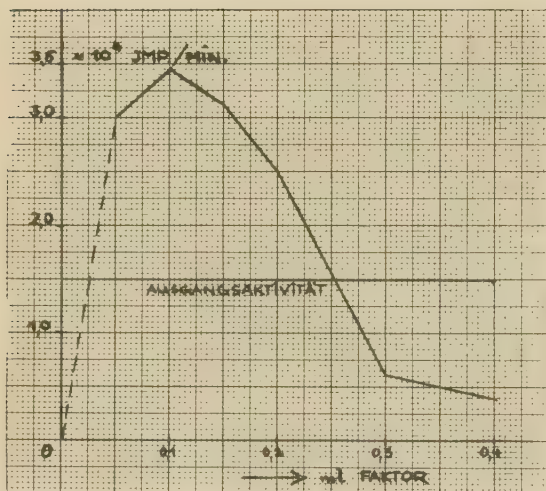


Abb. 2:

Fettsäuresynthese
bei Zusatz steigender
Mengen Faktor

Anders waren die Verhältnisse im Hungerversuch (Abb. 3). Die hierzu bestimmten Tauben erhielten drei Tage vor ihrer Verwendung kein Futter mehr. Das aus ihren Lebern präparierte Enzymsystem ermöglichte nur eine minimale Fettsynthese. Außerdem fand sich bei diesen Tieren nie ein Rückstand, aus welchem ein wirksamer Faktor hätte gewonnen werden können. Bei Zusatz von Sammelfaktor, welcher von Normaltieren stammte, ergab sich dagegen eine erhebliche Steigerung der Synthesefähigkeit, die auch bei Mengen von 0,2 u. 0,3 ml Faktor noch zunahm.

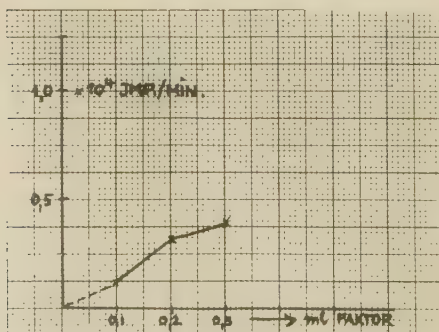


Abb. 3:

Steigerung der Fettsäuresynthese durch
Faktor im Hungerversuch

Offensichtlich wurden also die zur Fettsäuresynthese nötigen Fermente, welche der Leber unterernährter Versuchstiere fehlen, durch den Faktor aus irgendwelchen Quellen zur Verfügung gestellt.

Auf der Suche nach den die Fettsynthese hemmenden Bestandteilen des Leberhomogenats wurden sämtliche Fraktionen, die man beim Zentrifugieren regelmäßig verwarf, eingesetzt. Es ergab sich in keinem Fall ein bemerkenswerter Einfluß auf die Synthese. Homogenisierte man dagegen 1 g Leber mit 10 ml Wasser, so ergab sich eine deutliche Synthesehemmung. Am wirksamsten war in diesem Zusammenhang der Zusatz eines Homogenats aus Rattenleber (1 g/10 ml H₂O). Durch Erhitzen desselben konnte man die Hemmung teilweise aufheben.

Ein Mehrangebot an Fermentlösung vermochte die Fettsynthese nur in beschränktem Maße zu steigern. Erhitzte man eine bestimmte Menge Enzymlösung im Wasseroad und gab nach nochmaligem Homogenisieren einen Teil davon zu den Versuchsansätzen, so erhöhte sich der Azetateinbau deutlich. Der erzielte Effekt war weit geringer als der, den man mit Faktor erreichen konnte, doch wurde er stärker, wenn man das Homogenisieren nach dem Erhitzen unterließ und statt dessen das ausgeflockte Eiweiß abzentrifugierte. Der dabei entstehende Überstand imponierte als gelblich klare Flüssigkeit und brachte eine Zunahme der radioaktiven Fettsäuren um etwa 25 %, während das den Rückstand bildende denaturierte Eiweiß mit Puffer aufgenommen und homogenisiert eine Hemmung des Azetateinbaues um rund 15 % bewirkte. In den meisten Fällen lief die Wirkung dieses enteweißten Überstandes mit der des Faktors parallel, d.h. wenn der Faktor förderte, tat dies auch der erhitzte und zentrifugierte Überstand der gleichen Leberpräparation.

Dieser eiweißfreie Überstand war zum Experimentieren weit brauchbarer als der den Großteil an Faktor enthaltende Zentrifugenrückstand. Die Versuchsergebnisse erlaubten den Schluß, daß bei beiden Zusätzen die Wirkung von der gleichen Komponente ausging. Allerdings war der eiweißfreie Überstand

in anderen Mengenbereichen wirksam als der Faktor.

Bei Zugabe von 0,1 bis 0,3 ml erhitzten Überstand stieg die Fettsäuresynthese noch an.

Der Versuch, Sammelfaktor zu zentrifugieren, endete mit einem Mißerfolg. Erst nach mehrstündigem Abschleudern bei 15 000 Umdrehungen pro Minute ließen sich einzelne Fraktionen unterscheiden, die aber auch dann noch schwer gegeneinander abzugrenzen waren. Die zur Verfügung stehende Tourenzahl reichte für eine scharfe Trennung nicht aus. Der Faktor ging beim Zentrifugieren nicht in eine bestimmte Fraktion sondern war in allen Schichten zu finden. Die stärkste Wirkung ging jedoch wiederum vom Rückstand aus, welcher gleich dem Ausgangsmaterial bei der Faktorherstellung gallertige Konsistenz aufwies.

Trotz der Aufbewahrung bei 0° Celsius verlor jedes Faktorpräparat im Verlauf von etwa 8 - 14 Tagen seine Wirksamkeit. Weit besser ließ sich der Faktor in Form eines Azetontrockenpulvers konservieren. Dazu wurden 2,5 ml Sammelfaktor mit 2,5 ml Puffer verdünnt und bei niederen Temperaturen tropfenweise in 50 ml Azeton gegeben. Der sich bildende Niederschlag wurde nochmals in Azeton gewaschen, zentrifugiert und im Exsikkator getrocknet. Von dem fertigen Pulver entsprachen 15 mg etwa 0,125 ml Faktorpräparat.

Um den Verdacht, die Faktorwirkung beruhe auf der Gegenwart von Manganionen, zu entkräften, wurden Faktor und Manganionen neben- und miteinander eingesetzt. Während die Mehrzugabe von Faktor über 0,1 ml die Fettsäuresynthese regelmäßig zum Absinken brachte, stieg die Radioaktivität in einem Faktorversuch noch weiter an, sobald man Manganionen zugab (Tab. 2). Der Hungerversuch zeigte darin keinen Unterschied.

Tabelle 2:

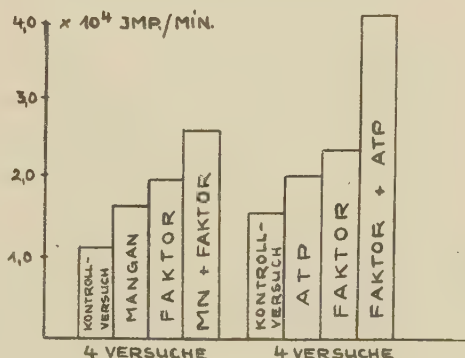
Steigerung der Fettsynthese bei Zugabe von Faktor + Mangan

NORMALVERSUCH			
KONTROLL-VERSUCH	MANGAN	FAKTOR	MANGAN + FAKTOR
$1,3 \cdot 10^4$	$21 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$28 \cdot 10^4$
$0,9 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$
$2,5 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^4$
HUNGERVERSUCH			
$0,1 \cdot 10^4$	$0,2 \cdot 10^4$	—	$0,8 \cdot 10^4$

Auch das Zusammenwirken von ATP und Faktor führte zu einer starken Zunahme der Aktivität. Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, waren Faktor + ATP sogar bedeutend wirksamer als Faktor + Mangan. ATP alleine verursachte wohl einen Anstieg der Fettsäuresynthese, doch blieb seine Wirkung weit hinter der von Manganionen zurück. Mangan und ATP zusammen zeigten keine bemerkenswerte Summierung ihrer Einzelwirksamkeit.

Abb. 4:

Erhöhung der Fettsynthese bei gleichzeitiger Zugabe von Faktor + Mangan bzw. Faktor + ATP



Der Faktor wurde im Wasserbad so intensiv erwärmt, daß im fertigen Präparat sicher keine wirksamen Mengen an ATP enthalten waren. Um so auffälliger war der Anstieg des ATP-Gehalts im Faktorversuch während der Inkubation (Abb. 5). Bereits nach 10 Minuten (1. Messung) war der ATP-Gehalt im Kontrollversuch geringer als im gleichzeitig laufenden Versuch mit Faktor. Von geringen Abweichungen abgesehen, liefen beide Zeit-ATP-Kurven parallel. Nicht zu übersehen war jedoch ein vorübergehender Anstieg des ATP während der Inkubation, und zwar im Kontroll- wie auch im Faktorversuch. Dieser

Effekt war nicht immer zu beobachten, wenn er aber auftrat, dann stets zwischen 40 und 80 Minuten. Anschließend sanken beide Kurven wieder ab, bis schließlich nach spätestens 180 Min. im Vergleichsversuch sämtliches ATP verbraucht war, während die Faktorkurve in keinem Fall den Nullpunkt erreichte. Der Verlauf der beiden Kurven ist insofern nur bedingt als gleichsinnig zu bezeichnen, als der Unterschied im ATP-Gehalt beider Versuche am Ende der Inkubation stets größer war als zu Anfang.

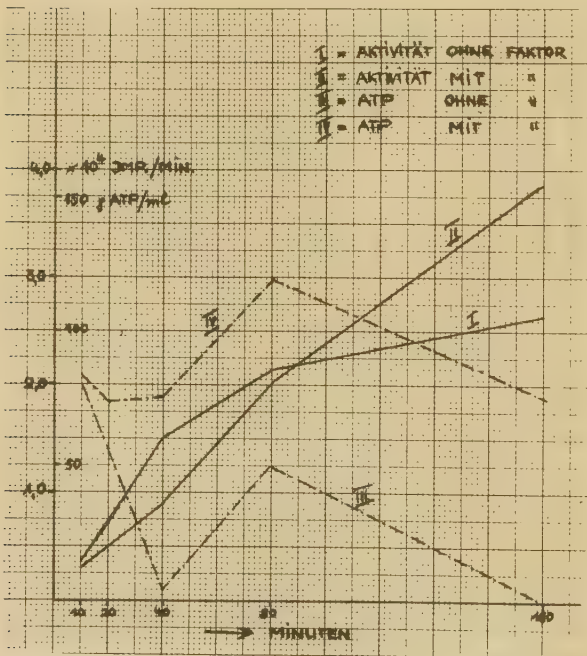


Abb. 5:

Fettsäuresynthese und ATP-Spiegel zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubation

Auch der jeweilige Stand der Fettsynthese nach bestimmten Zeitabschnitten ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Nach 10 Minuten Inkubation war die Aktivität im Faktorversuch stets geringer als im dazugehörigen Kontrollversuch. Während die Kurve des letzteren anfangs relativ steil anstieg und dann

allmählich auslief, stieg die Faktorkurve nur zögernd an, um dann ihrerseits einen ziemlich steilen Verlauf zu nehmen. Typisch war jedoch immer die Überkreuzung der beiden Kurven nach etwa 80 Minuten.

Durch Behandlung mit Dowex I bzw. Aktivkohle wurde die Enzymlösung in ihrer Qualität sehr gemindert. Faktor und Überstand dagegen verloren kaum an Wirksamkeit. Wegen des völligen Fehlens von Cofaktoren wie ATP, TPN bzw. TPNH war dies nicht anders zu erwarten. Durch Faktorzusatz zum ausgetauschten Enzymsystem konnte die durch Dowex oder Kohle erzielte Abnahme der Synthesefähigkeit aufgehoben werden.

4. Diskussion

Es gelang bisher nicht, den beschriebenen Faktor zu isolieren. Der beim Zentrifugieren des Taubenleberhomogenats entstehende Rückstand enthält sicher neben der als "Faktor" bezeichneten Substanz noch andere Stoffe, welche die Fettsäuresynthese ebenfalls beeinflussen. Es ist deshalb schwierig, über die Eigenschaften des Faktors exakte Aussagen zu machen. Mit Bestimmtheit darf man jedoch annehmen, daß er keine Eiweißstruktur besitzt.

Im lebenden Organismus ist er unter physiologischen Temperaturen sicher wirksam. Wahrscheinlich werden durch das Erhitzen im Wasserbad verschiedene Hemmfaktoren ausgeschaltet.

Der Faktorgehalt der Leber ist vom Ernährungszustand der Tauben abhängig, d.h. in 1 ml eines sog. Faktorpräparats sind wechselnde Mengen Faktor enthalten. Die Versuchsergebnisse sind also auch in dieser Hinsicht nur bedingt vergleichbar, solange der Faktor nicht isoliert werden kann. Es war nicht möglich, aus der Höhe der erzielten Fettsäuresynthese Rückschlüsse auf die Faktormenge zu ziehen.

In zahlreichen Fällen war die Ausgangsaktivität einer Versuchsreihe bereits so hoch, daß durch Faktorzusatz die Synthese höherer Fettsäuren nicht mehr gesteigert werden konnte. Manganionen dagegen vermochten die Aktivität zeitweise noch geringfügig zu erhöhen. Wie schon erwähnt, war es mit der verwendeten Zentrifuge nicht möglich, die Enzymlösung völlig zellfrei zu machen. Vielleicht waren in den genannten Fällen beim Zentrifugieren noch ausreichende oder sogar optimale Mengen an Faktor im Überstand zurückgeblieben.

In anderen Versuchsreihen stieg die Fettsäuresynthese selbst bei hohen Ausgangswerten nach Faktorzugabe noch weiter an. Dies läßt darauf schließen, daß diese hohen Ausgangsaktivitäten im Gegensatz zu obigen Beispielen durch einen besonders hohen Fermentgehalt des Überstandes bedingt waren. Hier konnte der Faktor noch zusätz-

lich wirken.

Aus Größe, Farbe und Konsistenz konnte man nicht immer auf die Qualität der Lebern schließen. Im allgemeinen aber schienen helle und verschiedentlich sogar schwammige Lebern eine besonders gute Enzymlösung zu liefern. Die Leber normal ernährter Tauben enthält sicher immer Faktor. Ikterische Lebern eignen sich nicht zur Darstellung von Faktor oder Überstand. Das nämliche gilt für Metastasenlebern.

Die Leber ist besonders reich an Mangan⁺⁺. Deshalb liegt die Vermutung nahe, die Faktorwirkung beruhe auf dem Vorhandensein dieser Ionen. Dagegen spricht jedoch der unterschiedliche Effekt von Mangan⁺⁺ und Faktor im Hungerversuch, sowie der ungleiche Verlauf der Aktivitätskurve beider Stoffe nach Zusatz steigender Mengen.

Vera v. Brand und E. Helmreich konnten zeigen, daß durch Mitochondrientrockenpulver die Glykolyse nicht gefördert, ja manchmal sogar gehemmt wird. Der Faktor vermag jedoch, wie aus bisher nicht veröffentlichten Versuchen der beiden Autoren hervorgeht, die Glykolyse zu steigern.

Die Literatur bietet nur sehr wenig Hinweise. V. von Brand und E. Helmreich berichteten als erste und bisher einzige Autoren über den Faktor (9, 10). Allerdings isolierten auch Catravas und Anker (11, 12) aus der Rattenleber einen die Fettsäuresynthese steigernden Faktor den sie "Lipogenin" nannten. Ob dieser mit dem Faktor der Taubenleber identisch ist, bleibt vorläufig noch ungewiß. Immerhin stellten Catravas und Anker eine Zunahme der Leberfettsäuren fest, wenn sie ihren Ratten Lipogenin in das Peritoneum spritzten. Allerdings nur bei Hungertieren.

V. von Brand und E. Helmreich (5) berichten von einer engen Koppelung zwischen Glykolyse und Fettsynthese. Demnach hängt letztere von einem ausreichenden Kohlenhydratstoffwechsel ab. Im Hungerzustand sistiert jedoch die Glykolyse. Dadurch werden vermindert DPNH und TPNH gebildet (13), welche ihrerseits als reduzierende Coenzyme zum Ablauf des "Lynenzyklus" erforderlich sind. Die Beziehungen zwischen Glykolyse und Fettsäuresynthese gehen also über die Transportfunktion von

DPN/DPNH und TPN/TPNH.

Nun aber wird durch Zusatz von Faktor die Glykolyse gesteigert. Vermutlich beeinflusst der Faktor also die Fettsynthese auf dem Umweg über den Glukoseabbau.

Die Radioaktivität in einem Warburg-Kölbchen als Maßstab für das Ausmaß der Fettsäuresynthese nahm bei der Inkubation um so rascher zu, je größer der ATP-Gehalt im jeweiligen Augenblick war. Nach 80 Minuten enthielt der Ansatz mit Faktor regelmäßig mehr ATP als zu Anfang der Inkubation. Dieses stammte wohl aus dem unter Faktoreinfluß nachweisbar erhöhten Zuckerabbau und wurde im Verlauf der freistündigen Inkubation nie völlig verbraucht. Beim Kontrollversuch dagegen fiel der ATP-Spiegel stets auf den Nullpunkt ab.

Wenn der Faktor die Glykolyse verstärkt, wird auch verständlich, warum ein durch Tierkohle oder Dowex von ATP, TPN und DPN völlig gereinigter Überstand nach Faktorzusatz wieder die zum Azetateinbau nötigen Katalysatoren enthält.

Auffällig war das regelmäßige Zurückbleiben der Fettsäuresynthese im Faktorversuch gegenüber der des Kontrollversuchs, welches stets zu Anfang der Inkubation zu beobachten war. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß unter Faktoreinfluß zunächst über eine verstärkte Glykolyse vermehrt ATP, TPNH bzw. DPNH zur Verfügung gestellt werden, welche dann ihrerseits die Fettsäuresynthese voll anlaufen lassen.

Auf welche Weise der Faktor die Glxkolyse steigert, ist noch unklar. Möglicherweise beruht seine Wirkung auf einem ähnlichen Mechanismus, wie ihn Berthet, Rall und Sutherland (14) für das Glukagon nachgewiesen haben, welches bei Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen in Leberhomogenaten die Phosphorylase der Leber aktiviert und so den Glykogenabbau steigert.

5. Zusammenfassung

- 1) Die Präparation eines Faktors aus der Taubenleber wurde beschrieben:
 - a) er war nur aus den Lebern normal ernährter Tiere zu gewinnen
 - b) durch Azetonfällung wurde ein Faktortrockenpulver hergestellt, welches besonders wirksam war und dessen aktivierende Eigenschaften über lange Zeit erhalten blieben.
- 2) Der Faktor zeigte folgende Eigenschaften:
 - a) in einer geeigneten Enzympräparation aus Taubenleber erhöhte er die Fettsäuresynthese aus markiertem Natriumazetat
 - b) auch in Fermentlösungen, die aus Lebern von Hungertauben hergestellt worden waren, steigerte der Faktor die Fettsynthese
 - c) durch Ionenaustauscher war der Faktor nicht zu beeinflussen, dagegen stieg in einem durch Tierkohle oder Dowex I seiner Synthesefähigkeit entledigten Fermentsystem die Fettsynthese nach Faktorzusatz wieder an
 - d) Faktor und ATP zusammen in einem Versuchsansatz bewirkten einen besonders intensiven Anstieg der Fettsäuresynthese
 - e) der Faktor erhöhte die Glykolyse
- 3) Die Ergebnisse wurden diskutiert

6. L i t e r a t u r

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1) Knoop F. | Beitr.chem.-phys+path.
6, 150 (1904) |
| 2) Lynen F., Ochoa S. | Biochem. et Ciophys. Acta
12, 299 (1953) |
| 3) Lynen F. | Nature (London) 174, 962,
4438 (1954) |
| 4) Lynen F. | Ann. Rev. Biochem. 24, 653
(1955) |
| 5) Brand V. von, Helmreich E. | Biochem. Zeitschr. 328, 146
(1956) |
| 6) Brady R. O., Gurin S. | J. of Biol. Chem. 199, 421,
(1952) |
| 7) Baalen J. van, Gurin S. | J. of Biol. Chem. 205, 1,
303 (1953) |
| 8) Diturì F., Gurin S. | Arch. Biochem./Biophys. 43,
231 (1953) |
| 9) Seitz W., Brand V. von | Z. für ges. Innere Med. 19,
764 (1953) |
| 10) Brand V. von, Seitz W. | Klin. Woch. (Sonderdr.) 2,
87/88 (1958) |
| 11) Catravas G. N., Anker H. S. | J. of Biol. Chem. 232, 2
(1958) |
| 12) Catravas G. N., Anker H. S. | Proc. of the Nat. Acad. of
Sciences 44, 11 (1958) |
| 13) Helmreich, Holzer, Lamprecht | Hoppe Seylers Z. 297, 113,
(1954) |
| 14) Berthet, Rall, Sutherland | J. Biol. Chem. 1959 (s.
Triangel-Sandoz Juli 59/S.
15) |

Herrn Professor Dr. Walter Seitz danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für die Beurteilung der Arbeit.

Frau Dr. Vera von Brand führte mich gewissenhaft in die Laborpraxis ein und korrigierte die Niederschrift der Arbeit. Ihr fühle ich mich zu besonderem Dank verpflichtet.

Den Medizinalassistentinnen Frl. Ingrid Thöring und Frl. Barbara von Kutschenbach verdanke ich tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit.

Nicht zuletzt spreche ich auch Herrn cand. med. Dietz v. Stetten meinen Dank aus für seine kollegiale Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Lebenslauf

Am 2. August 1934 wurde ich, Peter Max Otto Schreier, in Regensburg als Sohn des praktischen Arztes Dr. Max Schreier und seiner Ehefrau Ursula geboren. Die Volksschulzeit verlebte ich in meiner Vaterstadt. Gegen Kriegsende wurde ich mit meinen Angehörigen nach Brennberg/Bayr. Wald evakuiert. Nach dem Zusammenbruch kehrten wir nach Regensburg zurück, wo ich im Herbst 1946 in das Alte Gymnasium eintrat. Im Juli des Jahres 1954 erwarb ich hier das Reifezeugnis.

Mein Studium führte mich zunächst für zwei Semester nach Erlangen. Seit dem Herbst 1955 war ich an der Münchner Universität immatrikuliert, wo ich im Februar 1957 das ärztliche Vorexamen ablegte. Auch mein klinisches Studium verbrachte ich in München. Im Juni 1960 beschloß ich meine Studienzeit mit dem Staatsexamen.

